بهینه‌سازی تولید باسیتراسین توسط *Bacillus licheniformis* PTCC1721

ناصر قائمی[۱]، وحید حاتمی[۲]، محمد فائزی قاسمی*[۳]، میر ساسان میرپور[۴]

۱- دانشگاه تهران، پردیس علوم، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵

۲- عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان ایران، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۳و۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

(*عهده دار مکاتبات – faezi_m@yahoo.com)

چکیده

باسیتراسین به عنوان یک پلی پپتید دارای خاصیت ضدمیکروبی توسط گونه‌های مختلف جنس *Bacillus* تولید می‌شود که امروزه نقش مهمی را در علوم پزشکی و دامپزشکی ایفاء می کند. هدف از این پژوهش بهینه‌سازی ترکیبات غذایی محیط کشت و شرایط محیطی جهت بهبود تولید آنتی بیوتیک باسیتراسین توسط باکتری *Bacillus licheniformis* PTCC1721 با استفاده از روش یک فاکتور در زمان و روش تاگوچی می‌باشد. در این مطالعه اثرات منابع مختلف کربنی و نیتروژنی، شرایط محیطی از جمله اثرات pH های مختلف محیط کشت، درصد تلقیح جمعیت میکروبی در محیط و همچنین زمان انکوباسیون بر روی تولید باسیتراسین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که گلوکز به عنوان منبع کربن، ال- گلوتامیک اسید به همراه آب پپتونه به عنوان منبع نیتروژن با بررسی غلظت های مختلف آن‌ها در pH=۷ و ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری، افزایش میزان تولید باسیتراسین توسط *B. licheniformis* PTCC1721 را به همراه داشت. میزان تولید باسیتراسین که توسط دستگاه HPLC مورد سنجش قرار گرفت ۲۰۰/۱۷۴ U/ml^{-1} بود که در طی بهینه سازی محیط کشت به روش تاگوچی میزان تولید آن به ۴۲۲/۶۳۹ U/ml^{-1} افزایش یافت که این امر نشان دهنده تاثیر بهینه سازی محیط کشت و عوامل محیطی بر افزایش میزان تولید باسیتراسین می باشد.

کلمات کلیدی: باسیتراسین، *B. licheniformis* PTCC1721، بهینه‌سازی، HPLC.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

باسیتراسین یکی از مهمترین پلی پپتیدهای آنتی‌بیوتیکی می‌باشد که توسط برخی از سویه‌های باکتری *B. licheniformis* و *B. subtilis* تولید می‌شود. این آنتی‌بیوتیک در سال ۱۹۴۵ توسط maleney و همکاران از باکتری *B. licheniformis* جدا شده از خاک شناسایی شد و پس از جداسازی و خالص‌سازی آن به دنیای پزشکی و دام پزشکی معرفی گردید (۱).

باسیتراسین به عنوان یک آنتی‌بیوتیک باکتریواستاتیک، با جلوگیری از سنتز دیواره سلولی باکتریایی مانع رشد باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های گرم مثبت می‌شود. باسیتراسین بر روی کوکسی‌های گرم مثبت، باسیل‌های گرم مثبت، کلستریدیوم‌ها، *Coryne bacterium* و *spirochaetes* در یک محدوده ppm ۵۰۰-۵۰ دارای اثرات مهاری متفاوتی می‌باشد (۲). باسیتراسین از آن دسته از آنتی‌بیوتیک‌های موضعی در مقابل عفونت‌ها می‌باشد که به کرار به صورت مکمل به همراه آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند پلی میکسین B و نئومایسین که از جمله آنتی‌بیوتیک‌های وسیع طیف هستند، استفاده می‌شود. در محیط درون سلولی باسیتراسین به صورت سینرژیک با پنی‌سیلین عمل کرده و موجب از بین رفتن بعضی از میکروارگانیسم‌های مقاوم به پنی‌سیلین می‌شود (۱۱). باسیتراسین به عنوان یکی از مهمترین مکمل‌های غذایی، در جیره غذایی بسیاری از گونه‌های دامی استفاده می‌گردد. این عمل باعث بالا بردن ارزش و کیفیت غذای دام‌ها و در نتیجه افزایش بازدهی محصول می‌شود. محدوده غلظت باسیتراسین اضافه شده به غذای دام ها بین ppm ۱۰۰- ۵ در هر گرم است (۸). محیط-های مورد استفاده برای تولید باسیتراسین توسط باکتری‌های جنس باسیلوس دارای تنوع فراوانی می-باشند. مهم ترین محیط‌های مورد استفاده در فرایند بهینه سازی تولید باسیتراسین محیط کشت‌های حاوی منابع طبیعی مثل بلغور سویا و عصاره گوشت یا منابع مختلف کربنی و نیتروژنی مانند اسیدآمینه‌ها و کربوهیدرات‌ها (گلوکز و ساکارز) و برخی از اسیدهای آلی می‌باشند. بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد که تولید و بهینه سازی باسیتراسین توسط *B. licheniformis* در محیط کشت‌های بستر جامد و غوطه‌ور بسته به اجزای محیط کشت، همانند منابع کربنی و نیتروژنی، یون‌های معدنی و شرایط محیطی مثل زمان انکوباسیون، دمای محیط و pH محیط متفاوت می‌باشد (۵).

باکتری *B. licheniformis* PTCC 1721 به دلیل شباهت بسیار زیادی که از نظر ویژگی‌های زیستی و تولید متابولیت‌های مختلف با باکتری *B. licheniformis* ATCC 14580 ، یکی از بهترین سویه‌های تولیدکننده باسیتراسین دارد و همچنین به دلیل استاندارد بودن سویه، شرایط خوبی را در صورت تولید مناسب آنتی-بیوتیک باسیتراسین، باتوجه به وارداتی بودن این محصول در ابعاد صنعتی ایجاد می‌کند (۵).

در زمینه بهینه‌سازی روش‌های مختلفی وجود دارد که یکی از رایج‌ترین آن‌ها، روشهای کلاسیک می‌باشند. مهمترین روش کلاسیکی که می‌توان از آن نام برد روش یک فاکتور بر حسب زمان است که در آن تعداد زیادی از محتویات محیط کشت جهت به دست آوردن بهترین نتیجه، آزمایش می‌شود. بدین معنی که یک متغییر مستقل در یک سطح خاص تغییر داده شده و سایر پارامترها ثابت نگه داشته می‌شود. بدین ترتیب نقطه مطلوب آن متغیر به دست می‌آید. این روش برای تک‌تک پارامترها تکرار می‌گردد که بسیار

Archive of SID

www.SID.ir

وقت‌گیر و هزینه بر است. مهمترین اشکال روش مذکور این است که برهمکنش بین فاکتورها در نظر گرفته نمی‌شود یعنی نقطه حداکثر و حداقل در این محدوده لحاظ نمی‌گردد و به همین دلیل، مرحله بعد، طراحی پروسه بهینه سازی فضای مطلوب بوده که هدف از آن به دست آوردن تصویر کاملی از اثرات هر جزء از محیط کشت در تولید محصول می‌باشد. بعد از آن مرحله، استفاده از ابزارهای مختلف ریاضی و همچنین استفاده از روش‌های آماری مختلف مانند روش تاگوچی که به خصوص در سال‌های اخیر در فرایند بهینه‌سازی بیوتکنولوژی ایران به کار گرفته شده، می‌تواند به عنوان حوزه مطلوب شناسایی گردد (۶).

با استفاده از روش‌های فوق می‌توان تولید این آنتی بیوتیک را بهینه نمود که گامی بزرگ در جهت کمک به علوم پزشکی و دام پزشکی و تغذیه این مرز و بوم است. با توجه به اهمیت موضوع، در این تحقیق، بهینه سازی شرایط و ترکیبات محیط کشت و اثر آن‌ها روی تولید آنتی بیوتیک باسیتراسین توسط باکتری *B. Licheniformis* PTCC 1721 بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

سویه میکروبی و محیط کشت آن

در این تحقیق باکتری *B. licheniformis* PTCC 1721 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های صنعتی و عفونی) خریداری گردید. بعد از باز کردن بسته‌بندی سویه لیوفلیزه شده در زیر هود، در محیط‌های کشت نوترینت آگار شیب‌دار و در محیط کشت نوترینت براث به صورت مایع غوطه ور کشت داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت در انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس، از کلنی‌های ظاهر شده نمونه برداشته و پس از تهیه اسمیر، رنگ آمیزی گرم انجام گرفته و در زیر میکروسکوپ نوری باکتری‌های گرم مثبت و باسیلی شکل مشاهده شدند. این سویه‌ها در پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده و در یخچال نگه‌داری گردیدند.

محیط کشت پایه

به منظور رشد باکتری و تولید باسیتراسین از محیط کشت غوطه‌ور بر پایه محیط نوترینت براث استفاده گردید. مواد اضافه شده به این محیط شامل: ال-گلوتامیک اسید (۵)، مونو فسفات پتاسیم (۰/۵)، دی فسفات پتاسیم (۰/۵)، سولفات منیزیوم (۰/۲)، سولفات منگنز (۰/۰۱)، سولفات آهن (۰/۰۱)، کلرید سدیم (۰/۰۱)، سولفات کلسیم (۰/۰۱)، کلرید مس (۰/۰۱۵) و گلوکز(۱۰) به صورت گرم در یک لیتر از محیط نوترینت براث استفاده شدند.

پس از اتوکلاو کردن محیط، pH محیط با استفاده از NaOH یک نرمال و HCl یک نرمال در ۷ تنظیم گردید. ۱۰۰ میلی لیتر از این محیط را در ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و پس از آن به نسبت ۱۰٪ محیط، مایع پیش کشت باکتری *B. licheniformis* که از قبل تهیه شده بود اضافه کرده و در یک دوره زمانی ۱۴۴-۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس در انکوباتور شیکردار با ۱۵۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری شد. به فاصله هر۲۴ ساعت، حدود ۳-۲ میلی لیتر از محیط را برداشته و پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ با استفاده از صافی ۰/۲ میکرومتر مایع رویی صاف گردیده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

روش سنجش باسیتراسین

روش انتشار آگار

این روش برای تشخیص تولید باسیتراسین استفاده شد. باکتری‌های مورد استفاده در این روش شامل، *Enterococcus faecalis* PTCC 1394 ، *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 و *Streptococcus pyogenes* PTCC 1448 بودند. محیط مولر هینتون آگار برای کشت باکتری های *S. aureus* و *E. faecalis* و محیط Blood آگار برای کشت باکتری *S. pyogenes* استفاده گردید. سپس از آن‌ها محلول ۰/۵ مک فارلند ساخته شد. باکتری‌ها به صورت یکپارچه بر روی محیط کشت داده شدند. سپس با استفاده از انتهای پیپت پاستور یا انتهای سر سمپلر متوسط استریل، چاهک‌هایی به قطر ۸-۶ میلی متر بر روی محیط ایجادگردیدند. حدود ۵۰ میکرولیتر از مایع صاف شده در مرحله قبل درون چاهک‌ها ریخته شد. محلول باسیتراسین استاندارد با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در یک میلی لیتر آب مقطر به عنوان شاهد مثبت و آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی در تمامی پلیت‌ها در نظر گرفته شد و در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید. بعد از گذشت ۲۴ ساعت قطر هاله‌های عدم رشد ایجاد شده در هر یک از پلیت‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردیدند.

سنجش و جداسازی باسیتراسین توسط HPLC

از دستگاه HPLC از شرکت Hewlett Packard مدل 1050 ساخت کشور آمریکا برای سنجش و جداسازی باسیتراسین تولید شده در محیط استفاده گردید. آنالیز نمودار کروماتوگرام آن با تفکیک و جداسازی همه اجزاء محیط کشت و با توجه به وجود باسیتراسین استاندارد با تشخیص و سنجش غلظت باسیتراسین تولید شده صورت گرفت. ستون مورد استفاده در این سیستم (کروماسیل (C-18)) بوده و سرعت جریان مواد در ستون ۱/۴ میلی‌لیتر در دقیقه بوده است. برای تفکیک و جداسازی باسیتراسین تولید شده، از ردیاب UV در طول موج ۲۵۴ استفاده گردید.

بهینه سازی تولید باسیتراسین

در بررسی بهینه سازی تولید باسیتراسین عواملی مانند، منبع کربن، منبع نیتروژن، pH محیط، درصد تلقیح مایع باکتریایی در محیط و نمک‌های معدنی به عنوان اصلی‌ترین عوامل محیطی در رشد باکتری *B. licheniformis* و تولید باسیتراسین انتخاب گردیدند. برای دست‌یابی به منبع کربن مناسب از گلوکز، لاکتوز، ساکارز، مالتوز و D- فروکتوز در غلظت‌های (۵– ۱) درصد، برای منبع نیتروژن از ال-گلوتامیک اسید، آب پپتونه و عصاره مخمردر غلظت‌های (۲ – ۰/۲۵) درصد محیط، و برای یافتن pH بهینه محیط از pH = (۵، ۶، ۷، ۸، ۹) و درصد تلقیح باکتری *B. licheniformis* در محیط، در غلظت‌های (٪ ۱۵، ٪۱۲، ٪۱۰، ٪ ۷، ٪ ۵) درصد بررسی شدند.

بهینه سازی تولید باسیتراسین به روش یک فاکتور در یک زمان

پس از به دست آوردن همه شرایط بهینه در هر یک از مراحل کار این شرایط را به طور کلی برای باکتری فراهم کرده و میزان تولید باسیتراسین بررسی گردید. مقادیر مورد نیاز برای ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت را پس از اتوکلاو کردن و تلقیح باکتری، در

Archive of SID

www.SID.ir

انکوباتور شیکردار و در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس قرارداده شدند و در دوره زمانی ۱۴۴ – ۰ ساعت میزان تولید باسیتراسین مورد بررسی قرار گرفته شد.

بهینه‌سازی تولید باسیتراسین به روش تاگوچی

در این روش مهمترین فاکتورهای محیطی که بیشترین تاثیر را در تولید باسیتراسین داشتند و بهترین سطوح استفاده شده از آن‌ها در محیط کشت شناسایی، با استفاده از نرم افزار Minitab بهترین حالت ممکن برای افزایش تولید باسیتراسین طراحی شدند. برای اجرای بهینه سازی به روش تاگوچی از ۱۲ ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری که هر یک از فاکتورهای موجود در جدول (۱) به صورت متناوب و با توجه به برنامه نرم‌افزار Minitab در سطوح مختلف استفاده شدند.

جدول ۱: فاکتورها و سطوح مورد استفاده در فرمولاسیون پیشنهادی تاگوچی

سطح / فاکتور	سطح ۱	سطح ۲
گلوکز	۱٪	۲٪
ال-گلوتامیک اسید+ آب پپتونه	۰/۵ ٪	۱٪
pH	۷	۸
در صد تلقیح	۱۰ ٪	۱۲ ٪

نتایج

اثر زمان در تولید آنتی بیوتیک باسیترا-سین توسط *B. licheniformis*

بررسی اثر زمان تولید باسیتراسین توسط *B. licheniformis* در حضور نمونه استاندارد باسیتراسین و در محیط کشت پایه، با استفاده ازروش انتشار آگار بر روی *S. aureus*, *E. faecalis* , *S. pyogenes* انجام شد. بیشترین میزان تولید در زمان ۴۸ ساعت با قطر هاله عدم رشدی برابر با به ترتیب ۳۳، ۲۰، ۲۲ میلی‌متر به دست آمد. نتایج حاصل در شکل (۱) نشان داده شده است.

جدا سازی و سنجش باسیتراسین توسط HPLC

نتایج حاصل از بررسی اثر زمان در تولید باسیتراسین، با جدا سازی و سنجش این آنتی بیوتیک توسط دستگاه HPLC، میزان تولید باسیتراسین در محیط کشت پایه و پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون، برابر با U/ml^{-1} ۱۷۴ /۲۰۰ تعیین شد. شکل (۲).

اثر منابع مختلف کربنی در تولید باسیترا-سین

طبق تحقیقات به عمل آمده از میان منابع کربنی مختلف و بر اساس نتایج حاصل از روش چاهک و مشاهده اثرات ضد میکروبی آن‌ها و همچنین نتایج حاصل از آنالیز HPLC، گلوکز با تولیدی برابر ۲۰۰/۱۷۴ واحد به ازای میلی‌لیتر به عنوان بهترین منبع کربن با غلظت ۱ درصد در تولید بهینه آنتی‌بیوتیک باسیتراسین انتخاب گردید. بعد از آن لاکتوز با غلظت ۱ درصد تولیدی برابر با U/ml^{-1} ۹۰/۳۷۹ بیشترین اثر مثبت را در تولید باسیتراسین داشت. کمترین اثر مربوط به D- فروکتوز می باشد. شکل (۳).

Archive of SID

www.SID.ir

اثر منابع مختلف نیتروژنی در تولید باسیتراسین

بررسی نتایج حاصل از تاثیر منابع مختلف نیتروژنی در تولید باسیتراسین توسط باکتری *B. licheniformis* نشان دادند که ترکیب ال-گلوتامیک اسید و آب پپتونه (٪ ۰/۵) به صورت همزمان در محیط با تولیدی برابر با ۲۹۵/۱۴۵ واحد به ازای هر میلی لیتر به عنوان بهترین منبع نیتروژنی، بیشترین اثر را در تولید باسیتراسین، در طی ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری را دارا می باشد. شکل (۵).

اثر pH محیط در بهینه سازی تولید باسیتراسین

بررسی نتایج بدست آمده از مطالعه اثرpH بر تولید باسیتراسین در محیط‌های با pH مختلف، بر اساس روش انتشار آگار نشان داد که بیشترین تولید باسیتراسین در pH=۷ با قطر هاله‌های عدم رشدی برابر ۲۰، ۲۲، ۳۳ میلی‌متر به ترتیب بر روی *E. faecalis* ، *S. aureus* و *S. pyogenes* می‌باشد. میزان تولید باسیتراسین در این شرایط برابر ۱۷۴ /۲۰۰ U/ml^{-1} است. کمترین میزان تولید باسیتراسین در pH=۹ برابر با ۱۶/۴۵۳ U/ml^{-1} می‌باشد. جدول (۲).

اثر تلقیح جمعیت باکتریایی *B.licheniformis* در تولید باسیتراسین

در میان درصد های مختلف تلقیح باکتری در محیط کشت، تلقیح ٪ ۱۰ با تولیدی برابر با ۲۰۰/۱۷۴ U/ml^{-1} و بعد از آن تلقیح ٪ ۱۲ با تولیدی برابر با ۶۱/۹۰۷ واحد به ازای هر میلی‌لیتر بیشترین اثر را در تولید باسیتراسین داشتند. نتایج حاصل از روش انتشار آگار و اثر مربوط به تلقیح جمعیت میکروبی در شکل(۶) قابل مشاهده می‌باشد.

نتایج بهینه سازی تولید باسیتراسین به روش یک فاکتور در یک زمان

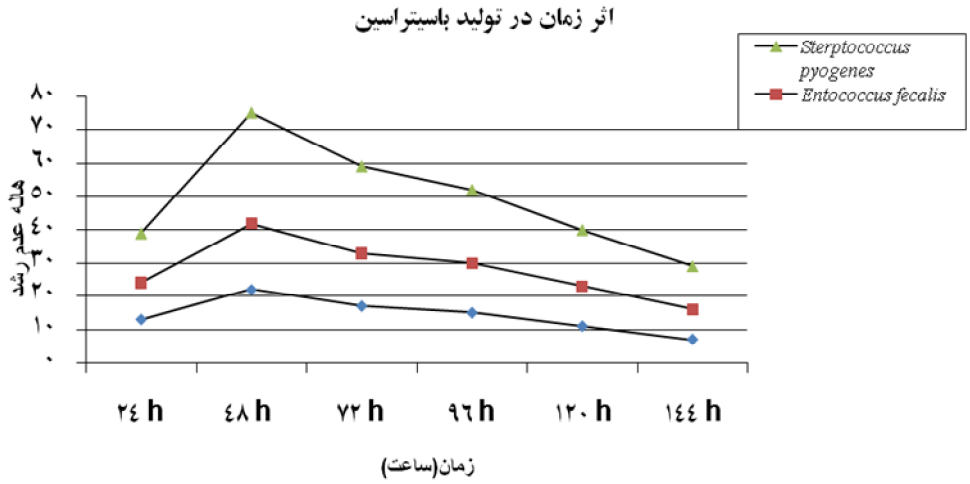
نتایج حاصل از بررسی بهترین نتایج در مراحل بهینه‌سازی باسیتراسین با روش یک فاکتور در یک زمان با استفاده از روش چاهک و با قطر هاله‌های عدم رشدی برابر با ۲۹، ۲۱، ۲۱ میلی‌متر بر روی به ترتیب *S. pyogenes* ، *S. aureus*، *E. faecalis* می‌باشد. میزان تولید باسیتراسین در این روش برابر با ۲۵۰/۵۹۳ واحد به ازای میلی‌لیتر می‌باشد.

بهینه‌سازی با فرمولاسیون پیشنهادی تاگوچی

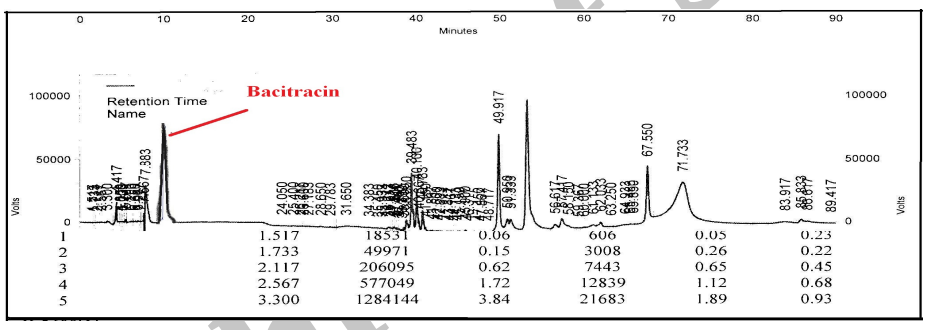
بررسی ۱۲ ارلن طراحی شده با فرمولاسیون تاگوچی نشان داد که ارلن شماره ۱ بیشترین اثر مثبت را در تولید بهینه آنتی بیوتیک باسیتراسین دارد. میزان تولید باستراسین در این سطح بهینه از فرمولاسیون تاگوچی برابر با ۴۲۲/۶۳۹ U/ml^{-1} می‌باشد نتایج حاصل در نمودار شکل (۷) بیان شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

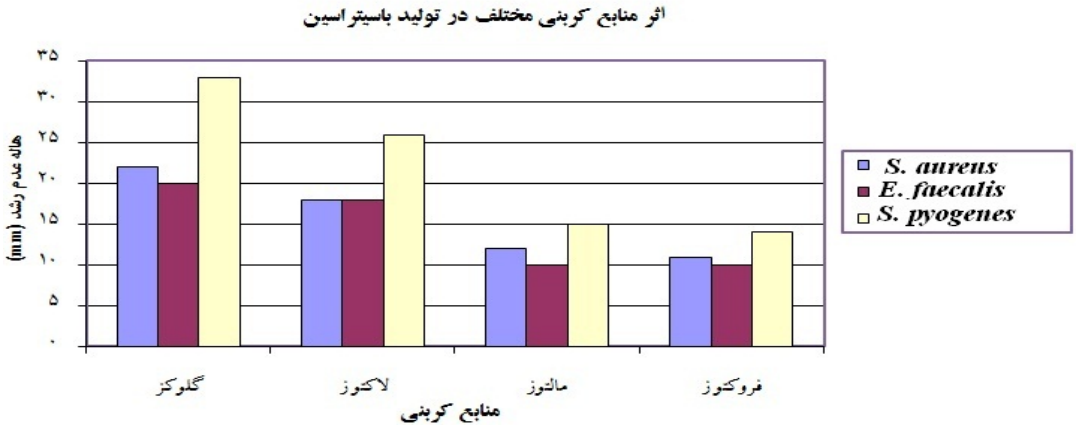


شکل ۱: بررسی میزان تولید باسیتراسین توسط *B.licheniformis* PTCC 1721 بر حسب زمان



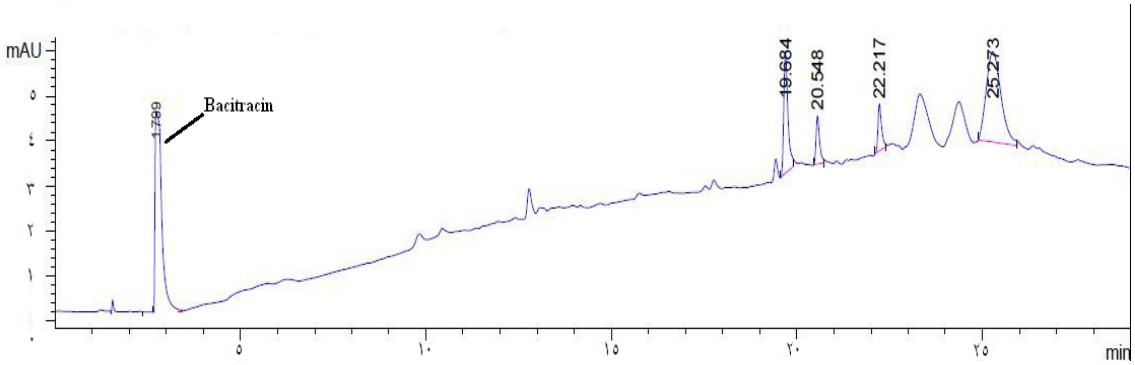
1	1.517	18531	0.06	606	0.05	0.23
2	1.733	49971	0.15	3008	0.26	0.22
3	2.117	206095	0.62	7443	0.65	0.45
4	2.567	577049	1.72	12839	1.12	0.68
5	3.300	1284144	3.84	21683	1.89	0.93

شکل۲: نمودار کروماتوگرام HPLC مربوط به باسیتراسین تولید شده توسط *B.licheniformis* PTCC 1721 بر حسب زمان

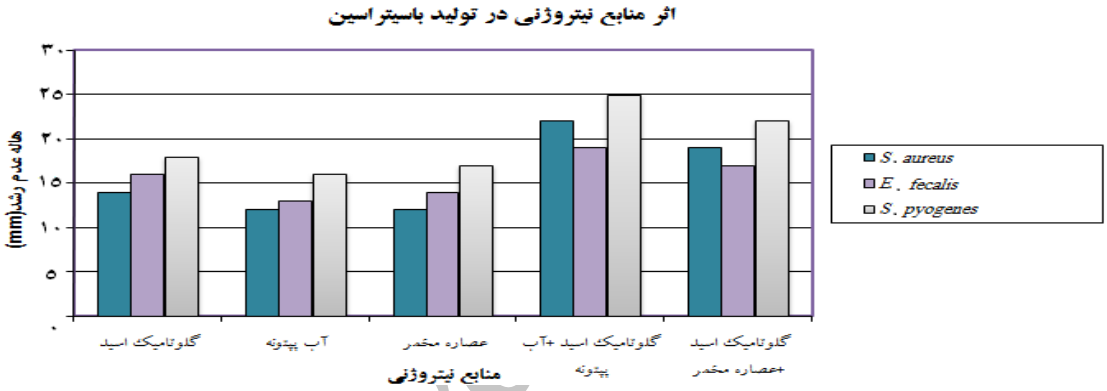


شکل۳: بررسی تولید باسیتراسین توسط *B.licheniformis* PTCC 1721 برحسب منابع کربنی

www.SID.ir



شکل۴: نمودار کروماتوگرامHPLC مربوط به باسیتراسین تولید شده توسط *B.licheniformis* PTCC 1721 بر حسب گلوکز

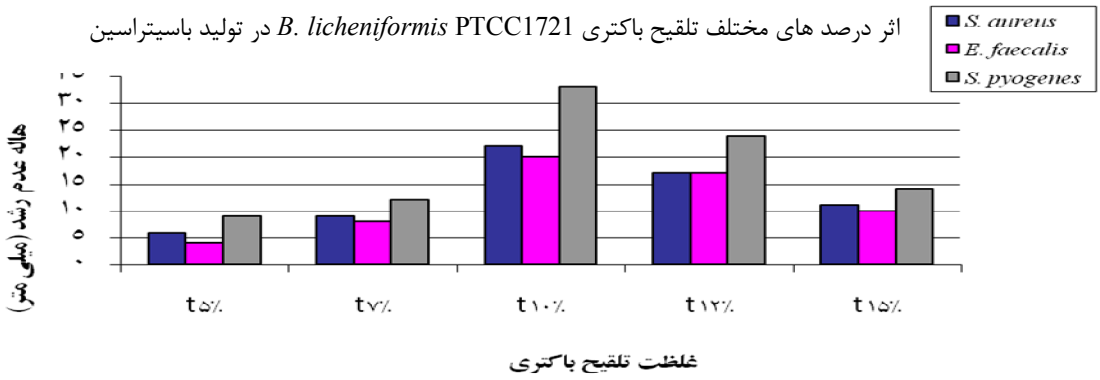


شکل ۵ :بررسی تولید باسیتراسین توسط *B.licheniformis* PTCC 1721 برحسب منابع مختلف نیتروژنی

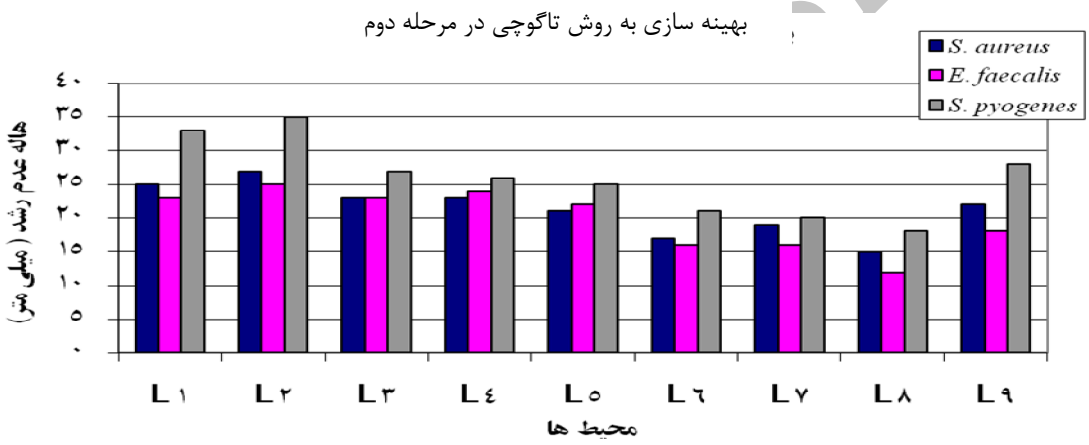
جدول ۲: بررسی تولید باسیتراسین توسط *B. licheniformis* PTCC 1721 بر حسب pH های مختلف محیط

S. pyogenes	*S. aureus*	*E. faecalis*	باکتری / pH محیط
۱۵	۱۳	۱۱	۵
۱۷	۱۵	۱۵	۶
۳۳	۲۲	۲۰	۷
۲۰	۱۵	۱۴	۸
۱۱	۷	۸	۹

Archive
www.SID.ir



شکل۶: اثر ضد میکروبی درصد های مختلف تلقیح باکتری در محیط به روش انتشار آگار



شکل۷: نتایج به دست آمده از بهینه سازی تولید باسیتراسین با فرمولاسیون پیشنهادی تاگوچی

بحث

میکرواگانیسم‌ها در میان پاره‌ای از ویژگی‌های فیزیکی و زیستی قادر به تولید آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند. تولید آنتی‌بیوتیک‌ها به ویژه آنتی‌بیوتیک‌های پلی پپتیدی در شرایط فیزیکی معمول قابل تغییر می‌باشند و تنها در یک محدوده کوچک از شرایط فیزیکی تولید بالا یا بهینه وجود دارد. از جمله عوامل موثر در تولید آنتی بیوتیک‌ها، pH محیط، دما و غلظت سوبستراها می‌باشند (۶).

در این تحقیق از روش‌های کلاسیک برای بهینه سازی محیط استفاده شده است واثر یک سری از شرایط مانند تغییر منابع و غلظت‌های مختلف کربنی و نیتروژنی، اثر درصد جمعیت باکتریایی، pH محیط و زمان انکوباسیون بر روی باکتری *B. licheniformis* PTCC 1721 در محیط بررسی شدند. هر یک از شرایط تعریف شده اثر متفاوتی برروی میزان رشد باکتری و تولید آنتی‌بیوتیک باسیتراسین داشته‌اند.

www.SID.ir

در مطالعه اثر منابع مختلف کربنی در تولید باسیتراسین توسط *B. licheniformis* PTCC 1721 نتیجه گرفته شد که با وجود گلوکز به عنوان منبع اصلی کربن در محیط کشت بیشترین تولید باستیراسین را داشته و تولید این آنتی‌بیوتیک در حضور دیگر قندها به عنوان منبع کربن پایین‌تر است. با اضافه کردن گلوکز ۱ درصد به محیط به عنوان بهترین مقدار منبع کربنی و ۴۸ ساعت انکوباسیون محیط کشت می‌توان شاهد بیشترین میزان تولید باستیراسین بود. غلظت‌های بالاتر از گلوکز به عنوان منبع کربن برخلاف افزایش رشد باکتری، کاهش تولید باسیتراسین را در پی دارد که این نشان دهنده خاصیت بازدارندگی گلوکز در رشد باکتری بوده و این امر شاید به دلیل سرعت مصرف بالائی گلوکز و ظاهر شدن اسیدهای آمینه آلی و همچنین کاهش pH محیط داخلی باکتری باشد.

Hanlon در سال ۱۹۸۱ نیز تولید باسیتراسین توسط باکتری *B. licheniformis* را در حضور گلوکز به عنوان منبع کربن گزارش نمود (۱۱).

Haavik در سال ۱۹۷۴ با کاربرد و مقایسه گلوکز، ساکارز، مالتوز، آرابینوز، زایلوز و لاکتوز به عنوان منبع کربن در بهینه سازی تولید باسیتراسین توسط باکتری *B. licheniformis* ATCC 10716 گلوکز را به عنوان بهترین منبع کربنی معرفی نمود (۸).

در تحقیق حاضر همچنین نتیجه گرفته شد که منابع نیتروژنی همچنین از مهمترین فاکتورها در تولید آنتی بیوتیک باسیتراسین هستند. در این مطالعه از گلوتامیک اسید به عنوان منبع نیتروژن در محیط پایه قبل از بهینه‌سازی استفاده گردید اما در در مراحل بهینه سازی ترکیب گلوتامیک اسید ٪ ۰/۵ و آب پپتونه ٪۰/۵ در محیط به عنوان بهترین منبع نیتروژنی برای تولید باستیراسین به دست آمد. استفاده همزمان دو منبع نیتروژن یعنی گلوتامیک اسید ٪ ۰/۵ و آب پپتونه ٪ ۰/۵ در کنار هم، با تولیدی برابر ۲۹۵/۱۴۵ واحد به ازای هر میلی‌لیتر برای اولین بار گزارش می شود.

Hadder و همکاران در سال ۲۰۰۷ نیز با استفاده از گلوتامیک اسید به عنوان بهترین منبع نیتروژن در محیط کشت باکتری *B.licheniformis* سویه B5 در تولید آنتی‌بیوتیک باستیراسین، با تولیدی برابر با ۱۳۱واحد به ازای هر میلی لیتر، به همین نتیجه دست یافتند (۷).

بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق بهترین pH محیطی و تاثیر آن در تولید باستیراسین توسط *B. licheniformis* PTCC 1721 ، pH =۷ می‌باشد که در محیط کشت پایه از تولیدی برابر با U/ml^{-1} ۲۰۰/۱۷۴ برخوردار است.

Flickinger و Perlman در سال ۱۹۷۹ تولید باسیتراسین توسط باکتری *B. licheniformis* جدا شده از خاک را در شرایط بهینه pH برای تولید باسیتراسین در سویه‌های مزوفیل را pH=۷ معرفی نمودند و اعلام داشتند که آنزیم مسئول تولیدآنتی بیوتیک باسیتراسین در محیط‌های اسیدی یا قلیائی، به دلیل شرایط به وجود آمده قادر به فعالیت و تولید باستیراسین نمی باشد(۷).

بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق وجود تلقیح ۱۰ درصدی از جمعیت میکروبی نسبت به حجم کل، بیشترین اثر را در تولید باستیراسین توسط *B. licheniformis* PTCC 1721 داشته است در حالیکه درصدهایی بالاتر همانند ٪ ۱۲ و ٪ ۱۵ میزان کمتری تولید را داشته‌اند، در نتیجه وجود درصدهای بالاتر از میزان جمعیت باکتریایی در محیط نمی‌تواند باعث افزایش تولید باستیراسین شود.

Archive of SID

www.SID.ir

در طی مطالعاتی که توسط Egorov و همکاران در سال ۱۹۷۷ و در بررسی عوامل محیطی موثر در تولید باسیتراسین توسط *B. licheniformis* ATCC 10716 انجام گرفت به این نتیجه رسیدند که وجود غلظت ۱۰ درصدی از جمعیت باکتریایی در محیط بیشتر از سایر عومل محیطی در تولید باسیتراسین نقش دارد(۴).

بر اساس نتایج بدست آمده از بهینه سازی تولید باستیراسین با فرمولاسیون پیشنهادی تاگوچی تاکنون در هیچ مطالعه دیگری انجام نگرفته و تحقیق حاضر به عنوان اولین پژوهش در این زمینه می باشد. میزان باسیتراسین تولید شده در محیط کشت پایه که حاوی گلوکز و گلوتامیک اسید به عنوان منبع کربن و نیتروژن اولیه در نظرگرفته شده بود، براساس نتایج بدست آمده از روش انتشار آگار و همچنین آنالیز نتایج حاصل از نمودار کروماتوگرام HPLC به میزان $۲۰۰/۱۷۴ U/ml^{-1}$ می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از بهینه‌سازی با فرمولاسیون پیشنهادی تاگوچی، محیط حاوی گلوکز ۱ درصد، ترکیب گلوتامیک اسید و آب پپتونه ۲ درصد، pH=۷، وجود تلقیح ۱۰ درصدی از جمعیت میکروبی به همراه درصدهای مشخص از نمک‌های معدنی تولید باسیتراسین به میزان $۴۲۲/۶۳۹ U/ml^{-1}$ افزایش یافته است بنابراین تولید باسیتراسین بیش از ۲ برابر نسبت به محیط کشت پایه در این تحقیق گزارش گردید.

سپاسگزاری

بدین وسیله از سرکار خانم محمدیان مسئول آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان که در طی مراحل اجرایی تحقیق همکاری داشتند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1. Azevedo, E. C., 1993. Bacitracin production by a new strain of *Bacillus Subtilis*. Extraction, purification and characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol*, vol. 42, pp. 1-7.
2. Alpharma, A., 1999, Bacitracin zinc – New evidence: resistance and safety to human health. February, vol. 86, pp. 319-320.
3. Froyshov, O., 1977. The production of bacitracin synthetase by *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. FEBS Letters,vol. 81, pp. 315-318.
4. Egorov, N. S., Loriia, Z., Vybornykh, S. N., Khamrun, R., 1986. Effect of culture medium composition on bacitracin synthesis and sporulation in *Bacillus licheniformis* 28 KA. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol*., vol 22, pp. 107-111.
5. Cao, M., Helmann, J. D., 2002. Regulation of the *Bacillus subtilis bcrC* bacitracin resistance gene by two extracytoplasmic function σ factors. J. Bacteriol., Vol. 184, pp. 6123-6129.
6. Faezi, G. M., Shojae-Arani, A., Moazami, N., Optimization of bacteriorhodopsin production by *Halobacterium salinarium* PTCC 1658, J.Biology, pp. 1-19.
7. Flickinger, M. C., Perlman, D., 1979. Application of oxygen-enriched aeration in the production of bacitracin *Bacillus licheniformis*. Antimicrob. Ag. Chemother., vol. 15, pp. 282-293.
8. Haavik, H. I., 1974. Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis*: Effect of glucose. J. Gen. Microbiol., vol. 81, pp. 290-383.
9. Haavik, H. I., 1974. Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis*: Role of catabolite repression and organic acids. J. Gen. Microbiol., vol. 84, pp. 451-454.

Archive of SID

www.SID.ir

10. Haavik, H. I., 1974. Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis*: Effect of inorganic phosphate. J. Gen. Microbiol., 84: 226-230.
11. 11. Hanlon, G. W., Hodges, N. A., 1981. Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of *Bacillus licheniformis* on poorly utilized carbon and nitrogen sources. J. Bacteriol., vol.147, pp. 427-431.
12. Mathers, J., 2007. Bacitracin _ Natural Peptide with Minimal Resistance.
13. Smekal F, 1979, Fermentation production of bacitracin. *Czech*., vol. 175, pp. 992
14. Walton, J. R., 1978. The effect of zinc bacitracin on the susceptibility of selected gram negative and gram positive bacteria to therapeutic antibiotics. *Zentralbl Veterinaermed Reihe*, vol. 2 5, pp. 329-331.

Archive of SID

www.SID.ir